(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003年5月30日 (30.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/044188 A1

(51) 国際特許分類⁷: **C12N 15/00**, 5/10, A61K 48/00, 31/713, G01N 33/50, 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/12183

(22) 国際出願日: 2002年11月21日 (21.11.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-355896
2001年11月21日 (21.11.2001) JP

(71) 出願人 (*米国を除く全ての指定国について*): 三菱化学株式会社 (**MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION**) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都 千代田区 丸の内二丁目５番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (*米国についてのみ*): 程 久美子 (**TEI,Kumiko**) [JP/JP]; 〒113-0032 東京都 文京区 弥生１−５−１ 第２東亜マンション５０３号 Tokyo (JP). 梶 隆英 (**KAJI,Takahide**) [JP/JP]; 〒227-8502 神奈川県 横浜市 青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社内 Kanagawa (JP). 上田 龍 (**UEDA,Ryu**) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都 町田市 南大谷１１号 株式会社三菱化学生命科学研究所内 Tokyo (JP). 西郷 薫 (**SAIGO,Kaoru**) [JP/JP]; 〒168-0063 東京都 杉並区 和泉４−３１−７ Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(**OGURI,Shohei et al.**); 〒107-6028 東京都 港区 赤坂一丁目１２番３２号 アーク森ビル２８階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (*国内*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (*広域*): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(54) **Title:** METHOD OF INHIBITING GENE EXPRESSION

(54) **発明の名称:** 遺伝子発現阻害方法

(57) **Abstract:** A method of inhibiting the expression of a target gene which comprises transferring a double-stranded polynucleotide consisting of a DNA having a sequence substantially identical with at least a part of the base sequence of the target gene and RNA into a cell, a tissue or an individual.

(57) 要約:

本発明は、標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することによる標的遺伝子の発現阻害方法に関する。

WO 03/044188 A1

明　細　書

遺伝子発現阻害方法

技術分野

本発明は、標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することによる標的遺伝子の発現阻害方法に関する。

背景技術

細胞、組織、あるいは個体内の標的遺伝子の発現阻害方法のひとつとして２本鎖RNAを該細胞、組織、あるいは個体内に導入することによりその配列に相同性を持つmRNAの分解を促進し、結果的にmRNAの鋳型となる遺伝子の発現を阻害する（以下この効果を「RNAi 効果」と称することがある）方法（以下これを「RNAi 法」と称することがある）がある。この手法はこれまで植物（Waterhouse, P. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 13959-13964 (1998)）、トリパノソーマ（Ngo, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95, 14687-14692(1998)）、ヒドラ（Lohmann, J. U., et al., Dev. Biol. ,214, 211-214(1999)）、プラナリア（Sanchez Alvarado, et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA., 96, 5049-5054 (1999)）、線虫（Fire, A., et al., Nature, 391, 806-811 (1998)）、ショウジョウバエ（Kannerdell, J. R., et al., Cell, 95, 1017-1026 (1998)；Misquitta, L., et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA., 96, 1451-1456(1999)）の個体で効果的であることが報告されている。

また、脊椎動物においてその効果は限定的であるとされていたが、３’末端に２ベース突出したそれぞれ１９ヌクレオチドからなる２本鎖RNAを用いれば、脊椎動物の培養細胞において、RNAi 効果が見られることが報告されている（Elbashir, S., et al., Nature, 411, 494-498(2001)）。後述する遺伝子機能の同定や、有用物質生産に適した細胞株等のスクリーニング方法において、RNAi 法を用いる優位性は明らかであるが、RNAは特に１本鎖の状態ではRNA分解酵素に

よって極めて容易に分解され、かつ製造費用が高額であるという問題点がある。従って、RNAi 法に用い得る安定性の高いポリヌクレオチドの開発が望まれていた。

発明の開示

本発明は、DNA を含むことにより安定性の高まった２本鎖ポリヌクレオチドを細胞、組織、あるいは個体に導入することにより、該ポリヌクレオチドが有する塩基配列と実質的に一部が同一の配列を有する標的遺伝子の発現を阻害する方法を提供すること等を課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意努力を重ねた結果、ハムスター培養細胞である CHO-KI において、ルシフェラーゼ遺伝子の一部の塩基配列を有する DNA と RNA のハイブリッドである２本鎖ポリヌクレオチド、および DNA と RNA のキメラである２本鎖ポリヌクレオチドを導入したところ、該細胞内においてルシフェラーゼ遺伝子の発現が阻害されることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明によれば、下記（１）～（２４）に記載の発明が提供される。

（１）標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する DNA と RNA からなる２本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することを特徴とする標的遺伝子の発現阻害方法。

（２）２本鎖ポリヌクレオチドが、自己相補性を有する１本鎖からなることを特徴とする上記（１）に記載の方法。

（３）２本鎖ポリヌクレオチドが、DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドであることを特徴とする上記（１）または（２）に記載の方法。

（４）DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドが、センス鎖が DNA で、アンチセンス鎖が RNA であることを特徴とする上記（３）に記載の方法。

（５）２本鎖ポリヌクレオチドが、DNA と RNA のキメラであることを特徴とする上記（１）または（２）に記載の方法。

（６）２本鎖ポリヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流側の一部が RNA であることを特徴とする上記（１）～（５）のいずれかに記載

の方法。

（７）上流側の一部が、９～１３ヌクレオチドからなることを特徴とする上記（６）に記載の方法。

（８）２本鎖ポリヌクレオチドが、１９～２５ヌクレオチドからなり、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流１／２がRNAであることを特徴とする上記（１）～（６）のいずれかに記載の方法。

（９）標的遺伝子が、複数であることを特徴とする上記（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（１０）上記（１）～（９）のいずれかに記載の方法による標的遺伝子の発現阻害の結果、該細胞、組織、あるいは個体に現れる表現型の変化を解析することを特徴とする遺伝子の機能解析方法。

（１１）上記（１）～（９）のいずれかに記載の方法を用いた標的遺伝子の発現の阻害により、細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与する方法。

（１２）上記（１１）に記載の方法により得られる細胞、組織、あるいは個体。

（１３）上記（１２）に記載の細胞、組織、あるいは個体に被検物質を添加し、該細胞、組織、あるいは個体に付与された性質の変化を解析することを特徴とする、標的遺伝子が関与する疾病の予防、及び／または治療剤のスクリーニング方法。

（１４）上記（１３）に記載の方法により得られた物質を有効成分とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

（１５）上記（１３）に記載の方法により選抜された物質を製剤化することを特徴とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤の製造方法。

（１６）上記（１）～（９）のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が、特定の強さ以上のものを選択して解析することを特徴とする方法。

（１７）上記（１）～（９）のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター、及び該DNAの少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列から

なり、かつDNAを含む２本鎖RNAを細胞に導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が減弱した細胞、組織、あるいは個体を選択して解析することを特徴とする方法。

（１８）インディケータータンパク質が、タンパク質量とそれが発する信号量とが比例して変化していくものである上記（１６）または（１７）に記載の方法。

（１９）インディケータータンパク質が、ルシフェラーゼである上記（１６）～（１８）のいずれかに記載の方法。

（２０）(i) 標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する２本鎖ポリヌクレオチドであってDNAとRNAのキメラからなるものを作製し、(ii) 該２本鎖ポリヌクレオチドを細胞、組織、あるいは個体に導入し、(iii) 該細胞、組織、あるいは個体中の標的遺伝子の発現阻害度を測定し、(iv) 標的遺伝子の発現阻害にRNAであることが必要とされる配列を特定することを特徴とするRNAi法におけるRNAの機能部位の同定方法。

（２１）２本鎖ポリヌクレオチドが、その２本鎖のどちらか一方がRNA鎖であることを特徴とする上記（２０）に記載の方法。

（２２）上記（１）～（１１）、（１３）、（１５）～（２１）のいずれかに記載の方法に用いるための２本鎖ポリヌクレオチド。

（２３）少なくとも上記（２２）に記載の２本鎖ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

（２４）少なくとも上記（２２）に記載の２本鎖ポリヌクレオチドを含む上記（１）～（１１）、（１３）、（１５）～（２１）のいずれかに記載の方法を行うためのキット。

図面の簡単な説明

図１は、２本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた２１ヌクレオチドからなるセンス１本鎖ポリヌクレオチドならびに２１ヌクレオチドからなるアンチセンス１本鎖ポリヌクレオチドの配列を示す図である。いずれも左が５’末端、右が３’末端を意味し、太字がRNA、下線がDNAからなることを示す。

図２は、CHO-KI細胞に、DNA-RNAハイブリッドの２本鎖ポリヌクレオチド

を導入した場合のluc遺伝子発現の阻害を示す図である。

図３は、Ｓ２細胞に、センス鎖がRNAで、アンチセンス鎖がDNA-RNAキメラである２本鎖ポリヌクレオチドを導入した場合のluc遺伝子発現の阻害を示す図である。

図４は、HeLa細胞、及びHEK293細胞に、アンチセンス鎖がRNAで、センス鎖がDNA-RNAキメラである２本鎖ポリヌクレオチドを導入した場合のluc遺伝子発現の阻害を示す図である。

図５は、CHO－K1細胞に、DNA-RNAキメラである２本鎖ポリヌクレオチドを導入した場合のluc遺伝子発現の阻害を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

（１）RNAi法に用いるためのDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチド

本発明は、標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することを特徴とする標的遺伝子の発現阻害方法である。

本発明において、標的遺伝子とは、これを導入する細胞、組織、あるいは個体（以下これを「被導入体」と称することがある）にmRNA、及び任意にタンパク質を産出するように翻訳され得るものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、導入する対象物の内在性のものでも、また外来性のものでもよい。また、染色体上に存在する遺伝子でも、染色体外のものでもよい。外来性のものとしては、例えば、被導入体に感染可能なウィルス、バクテリア、真菌または原生動物のような病原体由来のもの等が挙げられる。その機能については、既知のものでも、未知のものでもよく、また、他生物の細胞内では機能が既知であるが、被導入体内では機能が未知のもの等でもよい。

これらの遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一な配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチド（以下、これを「２本鎖ポリヌクレオチド」と称することがある）とは、標的遺伝子の塩基配列のうち、いずれの部分でもよい２０ヌクレオチド以上の配列と実質的に同一な配列からなるもので

ある。ここで、実質的に同一とは、標的遺伝子の配列と５０％以上、好ましくは７０％以上、さらに好ましくは８０％以上の相同性を有することを意味する。ヌクレオチドの鎖長は１９ヌクレオチドから標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の全長までの如何なる長さでもよいが、１９～５００ヌクレオチドの鎖長を有するものが好ましく用いられる。ただし、哺乳類動物由来の細胞においては、３０ヌクレオチド以上の鎖長を有する２本鎖 RNA に反応して活性化するシグナル伝達系の存在が知られている。これはインターフェロン反応と呼ばれており（Mareus, P. I., et al., Interferon, 5, 115-180(1983)）、該２本鎖 RNA が細胞内に侵入すると、PKR（dsRNA-responsive protein kinase： Bass, B.L., Nature, 411, 428-429(2001)）を介して多くの遺伝子の翻訳開始が非特異的に阻害され、それと同時に２’、５’oligoadenylate synthetase（Bass, B.L., Nature, 411, 428-429(2001)）を介して RNaseL の活性化が起こり、細胞内の RNA の非特異的な分解が惹起される。これらの非特異的な反応のために、標的遺伝子の特異的反応が隠蔽されてしまう。従って哺乳類動物、または該動物由来の細胞、あるいは組織を被導入体として用いる場合には１９～２５、好ましくは１９～２３、さらに好ましくは１９～２１ヌクレオチドからなる２本鎖ポリヌクレオチドが用いられる。本発明の２本鎖ポリヌクレオチドは、その全体が２本鎖である必要はなく、５’、または３’末端が一部突出したものも含み、その突出末端は１～５ヌクレオチド、好ましくは１～３ヌクレオチド、さらに好ましくは２ヌクレオチドである。また、最も好ましい例としては、各ポリヌクレオチド鎖の３’末端が２ヌクレオチドずつ突出している構造を有するものが挙げられる。２本鎖ポリヌクレオチドは、相補性を有する部分が２本鎖となっているポリヌクレオチドを意味するが、自己相補正を有する１本鎖ポリヌクレオチドが自己アニーリングしたものでもよい。自己相補正を有する１本鎖ポリヌクレオチドとしては、例えば、逆方向反復配列を有するもの等が挙げられる。

さらに、DNA と RNA の混合については、DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッド型や、DNA と RNA のキメラ型等が用いられる。DNA 鎖と RNA 鎖のハイブリッドは、それを被導入体に導入した際に、標的遺伝子の発現が阻害される活性を有するものである限り如何なるものであってもよいが、好ましくは、センス鎖が DNA

であり、アンチセンス鎖がRNAであるものが用いられる。また、DNAとRNAのキメラ型では、それを被導入体に導入した際に、標的遺伝子の発現が阻害される活性を有するものである限り如何なるものであってもよい。２本鎖ポリヌクレオチドの安定性を高めるためにはDNAをできるだけ多く含むことが好ましいが、本発明のキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドのうち、RNAであることが標的遺伝子の発現阻害に必要な配列については、後述する標的遺伝子の発現阻害度の解析を行いながら発現阻害の起こる範囲で適宜決定していくことが望ましい。これにより、RNAi法におけるRNAの機能部位を同定することもできる。かくして決定されたキメラ型の好ましい例としては、例えば、２本鎖ポリヌクレオチドの上流側の一部がRNAであるものが挙げられる。ここで、上流側とは、センス鎖の５’側およびアンチセンス鎖の３’側を意味する。上流側の一部とは、上記２本鎖ポリヌクレオチドの上流の末端から９～１３ヌクレオチドの部分が好ましく挙げられる。また、このようなキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドとして好ましい例としては、ポリヌクレオチドの鎖長がそれぞれ１９～２１ポリヌクレオチドからなり、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流側１／２がRNAで、それ以外がDNAである２本鎖ポリヌクレオチドが挙げられる。また、このような２本鎖ポリヌクレオチドにおいて、アンチセンス鎖が全てRNAであると、標的伝子の発現阻害効果はさらに高い。

２本鎖ポリヌクレオチドの調製方法としては、特に制限はないが、それ自体既知の化学合成方法を用いることが好ましい。化学合成は、相補性を有する１本鎖ポリヌクレオチドを別個に合成し、これを適当な方法で会合させることにより２本鎖とすることができる。会合の方法として具体的には、例えば、合成した１本鎖ポリヌクレオチドを好ましくは少なくとも約３：７のモル比で、より好ましくは約４：６のモル比で、そして最も好ましくは本質的に同モル量（すなわち約５：５のモル比）で混合し、２本鎖が解離する温度にまで加熱し、その後徐々に冷却する方法等が挙げられる。会合した２本鎖ポリヌクレオチドは、必要に応じてそれ自体公知の通常用いられる方法により精製される。精製方法としては、例えばアガロースゲル等を用いて確認し、任意に残存する１本鎖ポリヌクレオチドを適当な酵素により分解する等して除去する方法を用いることができる。

また、自己相補正を有する１本鎖ポリヌクレオチドとして、逆方向反復配列を有するものを調製する場合には、該ポリヌクレオチドを化学合成等の方法で作製した後に上記と同様の方法で自己相補性を有する配列を会合させることにより調製する。

（２）２本鎖ポリヌクレオチドの細胞、組織、あるいは個体への導入、及び標的遺伝子の発現阻害

このようにして調製した２本鎖ポリヌクレオチドを導入する被導入体としては、標的遺伝子がその細胞内でRNAに転写、またはタンパク質に翻訳され得るものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、本発明で用いる被導入体は、細胞、組織、あるいは個体を意味する。

本発明に用いられる細胞としては、生殖系列細胞、体性細胞、分化全能細胞、多分化能細胞、分割細胞、非分割細胞、実質組織細胞、上皮細胞、不滅化細胞、または形質転換細胞等何れのものであってもよい。具体的には、例えば、幹細胞のような未分化細胞、器官または組織由来の細胞あるいはその分化細胞等が挙げられる。組織としては、単一細胞胚または構成性細胞、または多重細胞胚、胎児組織等を含む。また、上記分化細胞としては、例えば、脂肪細胞、繊維芽細胞、筋細胞、心筋細胞、内皮細胞、神経細胞、グリア、血液細胞、巨核球、リンパ球、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、白血球、顆粒球、ケラチン生成細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝細胞および内分泌線または外分泌腺の細胞等が挙げられる。このような細胞の具体例としては、CHO-KI細胞(RIKEN Cell bank)、ショウジョウバエＳ２細胞（Schneider, I., et al., J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353-365(1972)）、ヒトHeLa細胞（ATCC：CCL-２）、あるいはヒトHEK293細胞（ATCC：CRL-１５７３）等が好ましく用いられる。

さらに、本発明で被導入体となる個体として、具体的には、植物、動物、原生動物、ウィルス、バクテリア、または真菌種に属するもの等が挙げられる。植物は単子葉植物、双子葉植物または裸子植物であってよく、動物は、脊椎動物または無脊椎動物であってよい。本発明の被導入体として好ましい微生物は、農業で、または工業によって使用されるものであり、そして植物または動物に対して病原

性のものである。真菌には、カビ及び酵母形態両方での生物体が含まれる。脊椎動物の例には、魚類、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、マウス、ラット、サル及びヒトを含む哺乳動物が含まれ、無脊椎動物には、線虫類及び他の虫類、キイロショウジョウバエ（Drosophila)、および他の昆虫が含まれる。

被導入体への２本鎖ポリヌクレオチドの導入法としては、被導入体が細胞、あるいは組織の場合は、カルシウムフォスフェート法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、ウィルス感染、２本鎖ポリヌクレオチド溶液への浸漬、あるいは形質転換法等が用いられる。また、胚に導入する方法としては、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション法、あるいはウィスル感染等が挙げられる。被導入体が植物の場合には、植物体の体腔または間質細胞等への注入または灌流、あるいは噴霧による方法が用いられる。また、動物個体の場合には、経口、局所、（皮下、筋肉内及び静脈内投与を含む）非経口、経膣、経直腸、経鼻、経眼、腹膜内投与等によって全身的に導入する方法、あるいはエレクトロポレーション法やウィルス感染等が用いられる。経口導入のための方法には、２本鎖ポリヌクレオチドを生物の食物と直接混合することができる。さらに、個体に導入する場合には、例えば埋め込み長期放出製剤等として投与することや、２本鎖ポリヌクレオチドを導入した導入体を摂取させることにより行うこともできる。

導入する２本鎖ポリヌクレオチドの量は、導入体や、標的遺伝子によって適宜選択することができるが、細胞あたり少なくとも１コピー導入されるに充分量を導入することが好ましい。具体的には、例えば、被導入体がヒト培養細胞で、カルシウムフォスフェート法により２本鎖ポリヌクレオチドを導入する場合、０．１～１０００nMが好ましい。

ここで、２本鎖ポリヌクレオチドは、２種類以上のものを同時に導入することもできる。この場合、該ポリヌクレオチドの導入を受けた細胞、組織、あるいは個体（以下これを「導入体」と称することがある）においては、２種類以上の標的遺伝子の発現阻害が期待される。

本発明において、標的遺伝子の発現阻害とは、その発現を完全に阻害することだけでなく、m-RNA、もしくはタンパク質の発現量として２０％以上の阻害を意味する。標的遺伝子の発現阻害度は、標的遺伝子の RNA の蓄積、または標的遺

伝子によってコードされるタンパク質の産出量を、２本鎖ポリヌクレオチドの導入体と非導入体において比較することにより測定することができる。mRNA 量は、それ自体既知の通常用いられる方法により測定することができる。具体的には、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、定量的リバーストランスフェレースPCR、あるいは In situ hybridization 等を用いて行うことができる。また、タンパク質の産生量は、標的遺伝子がコードするタンパク質を抗原とする抗体によるウェスタンブロッティング法や、標的遺伝子がコードするタンパク質が有する酵素活性を測定すること等により測定することができる。

（３）導入体内の遺伝子の発現阻害による遺伝子機能解析方法

本発明の２本鎖ポリヌクレオチドによる導入体内の遺伝子の発現阻害の結果、該導入体に現れる表現型の変化を解析することにより導入した２本鎖ポリヌクレオチドが標的とする遺伝子の機能を同定することができる。

ここで、標的遺伝子はその機能が既知であっても、被導入体内での機能が未知のものであってもよい。該標的遺伝子に対応する２本鎖ポリヌクレオチドは上記（１）に記載のとおり調製され、（２）に記載の被導入体に同様にして導入する。導入体でその変化を解析すべき表現型は特に制限はされないが、例えば導入体の形態、導入体内物質量、導入体が分泌する物質量、導入体内物質の動態、導入体間接着、導入体の運動、あるいは導入体の寿命等の生命体行動が挙げられる。標的遺伝子の機能が、他の被導入体において既知の場合には、その機能に連関する表現型について解析することが好ましい。表現型の変化を解析する手段としては、導入体の形態の変化を解析する場合には、顕微鏡、あるいは肉眼的に検出する方法を用いることができる。また、導入体内の物質として、例えば mRNA の場合には、その量の解析方法として、ノーザンハイブリダイゼーション、定量的リバーストランスフェレースPCR、あるいは In situ hybridization 等が挙げられる。タンパク質の場合には、その量の解析方法として、標的遺伝子がコードするタンパク質を抗原とする抗体によるウェスタンブロッティング法や、標的遺伝子がコードするタンパク質が有する酵素活性を測定する方法等が挙げられる。このようにして解析した、導入体にのみ現れる表現型の変化は、標的遺伝子の発現阻害の

結果生じているものであるので、これを標的遺伝子の機能として同定することができる。

（４）２本鎖ポリヌクレオチドを用いた標的遺伝子発現阻害により細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与する方法

本発明の２本鎖ポリヌクレオチドを用いた標的遺伝子の発現阻害により、細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与することができる。特定の性質とは、標的遺伝子の発現阻害の結果、該導入体に現れるものをさす。ここでの標的遺伝子としては、その発現の阻害が導入体に与える性質がすでに判明しているものでもよいし、機能、もしくは導入体内での機能が未知のものでもよい。機能が未知の標的遺伝子については、これに対する２本鎖ポリヌクレオチドを導入した後に、該導入体が示す表現型のうち所望のものを選択することにより、該導入体に所望の性質を付与することができる。

被導入体に付与するべき所望の性質として、具体的には、例えば、細胞内生産機能、細胞外分泌を阻害する機能、細胞や DNA に対する障害の修復機能、特定の疾患に対する耐性機能等が挙げられる。具体的には、被導入体が植物個体等の場合、標的遺伝子としては、果実熟成に関連する酵素、植物構造タンパク質、若しくは病原性に関連する遺伝子等が挙げられる。

標的遺伝子の発現阻害が、特定の疾患に対する耐性機能を有する場合としては、特定のタンパク質の発現の上昇が特定の疾患の原因となる場合で、標的遺伝子は、上記タンパク質をコードする遺伝子や、上記タンパク質の発現を制御する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子等が挙げられる。具体的例としては、標的遺伝子が癌化／腫瘍化表現型の保持に必要である遺伝子であり、被導入体が癌性細胞、または腫瘍組織等である。

このような標的遺伝子に対する２本鎖ポリヌクレオチドは、標的遺伝子がコードするタンパク質の発現を阻害することから、標的遺伝子が関連する疾患の治療または予防薬として用いることができる。２本鎖ポリヌクレオチドを上記薬剤の有効成分として用いる場合には、該ポリヌクレオチドを単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いること

もできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、１～９０重量％の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

このような遺伝子を標的とする２本鎖ポリヌクレオチドが導入された導入体は、その遺伝子発現阻害に付随すると予測される表現型によって選択される。また、導入する２本鎖ヌクレオチドにおいて、特定の遺伝標識、例えば蛍光タンパク質等をコードする配列を連結しておけば、被導入体に該２本鎖ポリヌクレオチドと共に導入した蛍光タンパク質の発現阻害度に基づいて選択することも可能である。このうち、例えばガン抑制に機能する遺伝子を標的遺伝子とした場合、選択されるべき細胞の形質としては、増殖能の亢進や、細胞接着能の低下、あるいは運動（転移）能の亢進等、悪性腫瘍の形質等が挙げられる。また、生体リズムを調製する遺伝子を標的遺伝子とした場合、選択されるべき細胞の形質としては、細胞固有の概日リズムの消失等が挙げられる。さらには、環境変異原による DNA 損傷の修復等に関与する遺伝子を標的遺伝子とした場合、選択されるべき細胞の形質としては、変異原に対して感受性を示すこと等が挙げられる。

選択された導入体は、それぞれに適したそれ自体既知のクローン化技術により系として樹立、取得することができる。具体的には、被導入体が細胞である場合には、導入体は通常の培養細胞における細胞株樹立法である、限界希釈法、薬剤耐性マーカーによる方法等により細胞株として樹立、取得することができる。本発明で取得された特定の機能を付与された導入体は、有用物質の産生あるいは分泌効率が上昇した細胞株、細胞あるいは DNA 等に対する障害を与える環境要因に対して高感受性を示す細胞株、疾病に付随する形質を示し、疾病治療のモデルとして使用することができる。

このうち、疾病治療のモデルとなる細胞株の取得方法を、本発明のさらなる具体的な適用例として説明する。標的遺伝子としては、その発現量の低下、または欠如が疾病の原因となる遺伝子が挙げられる。具体的には、アルツハイマー病に

おけるPS１遺伝子、色素性乾皮症のXPA／XPD／XPF／XPG遺伝子やDNA polymerase η 遺伝子、大腸ガンのAPC遺伝子、乳ガンのBRCA１／BRCA２遺伝子、糖尿病のINS／INSR遺伝子等が挙げられる。

これらのヒト遺伝子等の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを、例えばヒト由来の培養細胞に導入することにより、ヒト型の疾病モデル細胞を取得することができる。

さらにこの特定の性質を付与された細胞、組織、あるいは個体に被検物質を接触させて、その遺伝子が関与する疾病の症状、あるいは形質に変化が現れるか否かを解析することによれば、上記疾病の治療剤、及び／または予防剤のスクリーニングを行うことも可能である。

このようなスクリーニングにより選択された物質を上記薬剤の有効成分として用いる場合には、該物質を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、１～９０重量％の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、あるいはシロップ剤等による経口投与、または注射剤、点滴剤、リポソーム剤、坐薬剤等による非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

（５）インディケーター遺伝子の発現阻害度を指標とした一次選択を用いる方法

本発明の上記（１）～（４）に記載した方法は、被導入体に標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを導入する方法であるが、本発明の方法では、さらに（ａ）インディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター、（ｂ）該インディケータータンパク質をコードする塩基配列の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを導入し、該インディケータータンパク質から発せられる信号量を指標として導入体を一次スクリーニングすることにより、導入体内での遺伝子の発現阻害がかかった導入体のみを解析することができ、効率的な解析を行うことができる。

本発明のさらに具体的な例として、被導入体を脊椎動物由来の培養細胞とし、インディケータータンパク質を蛍光タンパク質とした場合を説明する。脊椎動物由来の培養細胞に蛍光タンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを導入して培養し、該インディケータータンパク質から発せられる蛍光量が、特定の強さ以上の細胞を選択する。ここで選択された細胞に、さらにインディケータータンパク質をコードするDNAの少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを導入して培養して、インディケーター遺伝子の発現の阻害度を、該インディケータータンパク質から発せられる蛍光量の減弱度により解析する。

このような一次スクリーニングは、いずれも被導入体への２本鎖ポリヌクレオチドの導入が行われたことや、該導入体内で標的遺伝子の発現阻害が起こっていることを確認するものであるので、インディケータータンパク質は、そのタンパク質量とそれが発する信号量とが相関するものである必要がある。このようなタンパク質の具体例としては、ルシフェラーゼタンパク質が挙げられる。

さらには、標的遺伝子発現の阻害度を測定する場合に、インディケータータンパク質の発現量を基準として、標的遺伝子がコードするタンパク質量を算出することもできる。

（６）本発明に用いられるキット

上記（１）～（５）に記載した方法を行うためのキットとしては、２本鎖ポリヌクレオチド、インディケータータンパク質をコードするDNAを含むベクター、インディケーター遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチド、酵素、バッファー等の試薬類、ポリヌクレオチオド導入のための試薬類等が含まれる。本発明のキットは、これら全ての試薬類等を含む必要はなく、上記した本発明の方法に用いられるキットであればいかなる試薬類等の組み合わせであってもよい。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、下記の実施例は本発

明についての具体的認識を得るための一助とみなすべきものであり、本発明の範囲は下記の実施例により何ら限定されるものではない。

実施例１　CHO-KI細胞内に導入した２本鎖DNA-RNAハイブリッドによる標的遺伝子の発現阻害

（１）DNA-RNAハイブリッド型２本鎖ポリヌクレオチドの作成

標的遺伝子としてはホタル(Photinus pyralis)のluciferase遺伝子(P. pyralis luc 遺伝子：accession number：Ｕ４７２９６）を用い、これを含む発現ベクターとしてはpGL3-Controlベクター（Promega社製）を用いた。P. pyralis luc遺伝子断片はこのベクター中でSV40のプロモーターとポリAシグナルで挟まれた形になっている。またインディケーター遺伝子はウミシイタケ（Renilla reniformis)のluciferase遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとしてpRL-TK（Promega社製）を用いた。

本実施例に用いた２本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、２１ヌクレオチドからなるセンス鎖は配列番号１（DNA）または配列番号２（RNA）で示すものである。また、アンチセンス鎖は、配列番号３（DNA）または配列番号４（RNA）に示すものである。これらの配列について、DNAあるいはRNAのキメラ型１本鎖ポリヌクレオチドを図１に示すとおりに作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託した。センス鎖ポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子であるpGL3-Controlベクター中のP.pyralis luc遺伝子（全長１,６５３塩基対）の３８－５８番目のヌクレオチドに相当する。

P.pyralis luc遺伝子の発現を阻害するために用いた２本鎖RNA、２本鎖DNAならびに２本鎖DNA-RNAハイブリッドは、図１に示したセンス鎖FLs1（RNA）またはDFLs1(DNA)と、アンチセンス鎖FLa2（RNA）またはDFLa2（DNA）とを会合させることで作製した。会合は、センス１本鎖ポリヌクレオチド、アンチセンス１本鎖ポリヌクレオチドを10mM Tris-HCl(pH7.5), 20mM NaCl反応液中で９０℃、２分間加熱し、更に３７℃、１時間インキュベートし、その後室温になるまで放置することで行った。これによりセンス鎖とアンチセンス鎖は会合

し２本鎖ポリヌクレオチドが形成される。２本鎖ポリヌクレオチドの形成は、TBE 緩衝液中での２％アガロースゲルでの電気泳動で検定するが、上記条件では殆どすべての１本鎖ポリヌクレオチドが２本鎖ポリヌクレオチドに会合していた。

（２）標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及び２本鎖ポリヌクレオチドの培養細胞への導入

培養細胞としては CHO-KI 細胞(RIKEN Cell bank)を用い、培地は Dulbecco's modified Eagle's medium（Gibco BRL 社製）に非働化１０％牛胎児血清（Mitsubishi Kasei 社製）及び抗生物質として penicillin（Meiji 社製）１０units／ml、streptomycin（Meiji 社製）５０μg／ml を添加したものを用い、３７℃、５％CO_2存在下で培養した。

この CHO-KI 細胞は０．３×１０^{6}cells／ml の濃度で２４穴プレートにまき、１日後に Ca-phosphate 沈殿法（細胞工学ハンドブック、黒木登志夫ら編、羊土社（１９９２））で１．０μg pGL3- Control DNA、０．５μg pRL-TK DNA、及び０．０１、０．１、１、１０、１００nM の各２本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

（３）培養細胞内の遺伝子発現の測定

上記実施例１（２）で調製した細胞は２０時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega 社製）を用いて、２種類のルシフェラーゼ（Photinus pyralis luc 及び Renilla reniformis luc）タンパク質の発現量（ルシフェラーゼ活性）を測定した。蛍光の測定は Lumat LB９５０７ luminometer（EG&G Berthold）を用いて行った。

CHO-KI 細胞に導入した遺伝子の発現は、DNA-RNA ハイブリッド型２本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された（図２）。値はいずれも、インディケーター遺伝子の発現量（ルシフェラーゼ酵素活性）に対する標的遺伝子産物の非活性を示す。またこれらは3回の実験の平均値を示しており、図中の縦棒は標準偏差を示す。２本鎖ポリヌクレオチドを導入していない対照群に比べ、２本鎖 RNA 導入群の場合には２本鎖ポリヌクレオチドを１００nM 添加したとき、９６％、セン

ス鎖が DNA でアンチセンス鎖が RNA の２本鎖ポリヌクレオチド導入群では８０％の標的遺伝子発現の阻害が観察された。即ち、２本鎖ポリヌクレオチドのセンス側が DNA であったとしてもアンチセンス側が RNA であれば、２本鎖 RNA に比べて効果が弱いながら、CHO-KI 細胞での遺伝子発現を阻害し得ることが証明された。

実施例２　ショウジョウバエＳ２細胞内に導入した DNA-RNA キメラ型２本鎖ポリヌクレオチドによる遺伝子の発現阻害

（１）DNA-RNA キメラ型２本鎖ポリヌクレオチドの作製

標的遺伝子としては実施例１と同様の Photinus pyralis の luciferase 遺伝子（P. pyralis luc 遺伝子：accession number：Ｕ４７２９６）を用いた。またインディケーター遺伝子は Renilla reniformis の luciferase 遺伝子を用いた。さらに発現ベクターも実施例１に記載のものを用いた。

本実施例に用いた２本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、２１ヌクレオチドからなるセンス鎖は配列番号１（DNA）または配列番号２（RNA）で示すものである。また、アンチセンス鎖は、配列番号３（DNA）または配列番号４（RNA）に示すものである。これらの配列について、DNA あるいは RNA のキメラ型１本鎖ポリヌクレオチドを図１に示すとおりに作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託した。

P. pyralis luc 遺伝子の発現を阻害するために用いる DNA-RNA キメラ型２本鎖ポリヌクレオチドは、図１に示したセンス鎖 FLs1(１本鎖 RNA)とアンチセンス鎖 FLa2-1、Fla2-2、Fla2-3、Fla2-4、Fla2-5、Fla2-6、Fla2-7、Fla2-8、FLa2-9、Fla2-10（DNA-RNA キメラ型１本鎖ポリヌクレオチド）とをそれぞれ会合させることで作製した。会合の方法としてはセンス１本鎖 RNA、アンチセンス DNA-RNA キメラ型１本鎖ポリヌクレオチドを実施例１と同様にして反応させた。２本鎖ポリヌクレオチドの産生は TBE 緩衝液中での２％アガロースゲルでの電気泳動で検定した。

（２）標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及び DNA-RNA キメラ型２本鎖ポ

リヌクレオチドの培養細胞への導入

培養細胞としてはショウジョウバエＳ２細胞（Schneider, I., et al., J. Embryol. Exp. Morph., 27, 353-365(1972)）を用い、培地は Schneider's Drosophila medium（Gibco BRL 社製）に非働化１０％牛胎児血清（Mitsubishi Kasei 社製）及び抗生物質として penicillin（Meiji 社製）１０units／ml、streptomycin（Meiji 社製）５０μg／ml を添加したものを用い、２５℃、５％ CO_2 存在下で培養した。

このＳ２細胞は１．０×１０^{6}cells／ml の濃度で２４穴プレートにまき、１日後に Ca-phosphate 沈殿法（細胞工学ハンドブック、黒木登志夫ら編、羊土社（１９９２））で１．０μg pGL-3 Control DNA、０．０５μg pRL-TK DNA、及び１００nM の各２本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

（３）培養細胞内の遺伝子発現の測定

上記実施例２（２）で調製した細胞は２０時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega 社製）を用いて、２種類のルシフェラーゼタンパク質の発現量を測定した。蛍光の測定は Lumat LB９５０７ luminometer（EG&G Berthold）を用いて行った。

Ｓ２細胞に導入した遺伝子の発現は、２本鎖のうちのセンス側を RNA に固定し、アンチセンス側を DNA と RNA のキメラ型ポリヌクレオチドにして作製した２１ヌクレオチドからなる DNA-RNA キメラ型２本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された（図３）。値はいずれも、インディケーター遺伝子の発現量（ルシフェラーゼ活性）に対する標的遺伝子産物の比活性として求め、３回の実験の平均値、及び標準偏差で示した。２本鎖ポリヌクレオチドの内、アンチセンス側が FLa2、FLa2-2、FLa2-3、FLa2-8、FLa2-9 であるものは、２本鎖ポリヌクレオチドを導入していない対照群に比べ、それぞれ９６％、９２％、９４％、９１％、９６％と、ほぼ同等に強く遺伝子発現を阻害した。アンチセンス側が FLa2-5 であるものは、７３％と比較的強い阻害効果を示した。アンチセンス側が FLa2-1、FLa2-4、FLa2-6、 FLa2-7、FLa2-10 であるものは、全く阻害効果がないか、あるいは阻害が認められても極めて弱い効果であった。強い効果を示した２本鎖ポリヌク

レオチドに共通する特徴の一つは、アンチセンス鎖の配列上、５’末端から１３、１４番目の２ヌクレオチドがRNA(UA)であることである。一方、効果の弱かった２本鎖ポリヌクレオチドにおいては、いずれもアンチセンス鎖配列上の同２ヌクレオチドがDNA(TA)であった。従って、S２細胞を用いた本実施例においては、この２ヌクレオチドが、強いRNAi効果の発現にとって必要かつ十分の領域であることが示唆される。

本実施例においては、アンチセンス配列上のこの領域を含む部分をRNAとして保存し、その他の部分をDNAに置換した２本鎖ポリヌクレオチドの導入によってもRNAi効果が認められた。本実施例で用いたような方法ならびにその他の手法によって、RNAi効果の発現に必要かつ十分とされる領域を特定あるいは予測し、この領域を含む部分をRNAとして保存し、その他の部分をDNAに置換して作製したそれぞれ２１ヌクレオチドからなる２本鎖ポリヌクレオチドは、RNAi効果によって標的遺伝子の発現を阻害できると推測される。

実施例３　ヒトHeLa細胞、及びヒトHEK293細胞に導入したDNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドによる遺伝子の発現阻害

（１）DNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドの作製

標的遺伝子としては実施例１と同様にP.pyralis luc遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとしては、pGL3-Controlベクター（Promega社製）を用いた。またインディケーター遺伝子はRenilla reniformisのluc遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとしてpRL-TK（Promega社製）を用いた。

本実施例に用いた２本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、２１ヌクレオチドからなるセンス鎖は配列番号１（DNA）または配列番号２（RNA）で示すものである。また、アンチセンス鎖は、配列番号３（DNA）または配列番号４（RNA）に示すものである。これらの配列について、DNAあるいはRNAのキメラ型１本鎖ポリヌクレオチドを図１に示すとおりに作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託した。センス鎖ポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子であるpGL3-Controlベクター中のP.pyralis luc遺伝子（全長１,６５３塩基対）の３８－５８番目のヌクレオ

チドに相当する。

P.pyralis luc遺伝子の発現を阻害するために用いたDNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドは、図１に示したセンス鎖FLs1-1、FLs1-2(DNA-RNAキメラ型１本鎖ポリヌクレオチド)とアンチセンス鎖Fla2（１本鎖RNA）とをそれぞれ会合させることで作製した。会合の方法としてはセンスDNA-RNAキメラ型１本鎖ポリヌクレオチド、アンチセンス１本鎖RNAを実施例１と同様にして反応させた。２本鎖ポリヌクレオチドの産生はTBE緩衝液中での２％アガロースゲルでの電気泳動で検定した。

（２）標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及びDNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドの培養細胞への導入

標的遺伝子を発現するための組換え発現ベクターは、上記（１）に記載のpGL3-Controlを用い、インディケーター遺伝子の発現ベクターは、上記（１）に記載のpRL-TKを用いた。培養細胞としてはヒトHeLa細胞（ATCC：CCL-２)、及びヒトHEK293細胞（ATCC：CRL-１５７３）を用い、培地はDulbecco's modified Eagle's medium（Gibco BRL社製）に非働化１０％牛胎児血清（Mitsubishi Kasei社製）及び抗生物質としてpenicillin（Meiji社製）１０units／ml、streptomycin（Meiji社製）５０μg／mlを添加したものを用い、３７℃、５％CO$_2$存在下で培養した。

HeLa細胞、HEK293細胞はそれぞれ０．５×１０^{6}cells／ml、０．２５×１０６cells／mlの濃度で２４穴プレートにまき、１日後にCa-phosphate沈殿法で１．０μg pGL3-Control DNA、１．０μg pRL-TK DNA、及び１００nMの各DNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

（３）培養細胞内の遺伝子発現の測定

実施例１と同様に、上記実施例３（２）で調製した細胞は２０時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay Systemを用いて、２種類のルシフェラーゼタンパク質の発現量を測定した。蛍光の測定はLumat LB９５０７ luminometerを用いて行った。

HeLa 細胞ならびに HEK293 細胞に導入した遺伝子の発現は、２本鎖のアンチセンス側を RNA に固定し、センス側を DNA と RNA のキメラポリヌクレオチドにして作製した２１ヌクレオチドからなる２本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された（図４）。値はいずれも、インディケーター遺伝子の発現量（ルシフェラーゼ酵素活性）に対する標的遺伝産物の比活性として求め、３回の実験の平均値、及び標準偏差で示した。２本鎖ポリヌクレオチドの内、センス側が FLs1-2 であるものを導入した群は、２本鎖ポリヌクレオチドを導入していない対照群に比べ、９０％（HeLa 細胞）、９５％（HEK293 細胞）と、２本鎖 RNA(FLs1/FLa2)導入群と同等の強い阻害効果を示した。FLs1-2 は配列上５’側の１２ヌクレオチドが RNA であり、その他の領域のヌクレオチドが DNA である。従って、HeLa 細胞ならびに HEK293 細胞を用いた本実施例においては、アンチセンス鎖を RNA とした場合、センス側の該１２ヌクレオチドの全体あるいはその一部が、強い RNAi 効果の発現にとって必要かつ十分の領域であることが示唆される。

実施例４　ヒト CHO-K1 に導入した DNA-RNA キメラ型２本鎖ポリヌクレオチドによる遺伝子の発現阻害

（１）DNA-RNA キメラ型２本鎖ポリヌクレオチドの作製

標的遺伝子としては実施例１と同様に P.pyralis luc 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとしては、pGL3-Control ベクター（Promega 社製）を用いた。またインディケーター遺伝子は Renilla reniformis の luc 遺伝子を用い、これを含む発現ベクターとして pRL-TK（Promega 社製）を用いた。

本実施例に用いた２本鎖ポリヌクレオチドの作製に使われた、２１ヌクレオチドからなるセンス鎖ポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子である pGL3-Control ベクター中の P.pyralis luc 遺伝子（全長１,６５３塩基対）の８－２８番目（８－２８）、３８－５８番目（３８－５８）、１０８７－１１０７番目（１０８７－１１０７）のポリヌクレオチドに相当する。

それぞれの塩基配列は、８－２８のセンス鎖が配列番号５（DNA）、６（RNA）、アンチセンス鎖が配列番号７（DNA）、８（RNA）に示すものであり、３８－５８のセンス鎖が配列番号１（DNA）、２（RNA）で、アンチセンス鎖が配列番号

３（DNA)、４（RNA）に示すものである。また１０８７－１１０７のセンス鎖の塩基配列は配列番号９（DNA)、１０（RNA）で、アンチセンス鎖が配列番号１１（DNA)、１２（RNA）で示すものである。

これらの配列について、上流側の約半分（１０～１３ヌクレオチド）がセンス、アンチセンス共にRNAであるもの（C)、上流側の約半分（１０～１３ヌクレオチド）がセンス、アンチセンス共にDNAであるもの（D）であるもの、アンチセンスがRNAであり、センス鎖の上流の約半分（１０～１３ヌクレオチド）がRNAであるもの（E)、センス鎖がRNAであり、アンチセンス鎖の上流の約半分（１０～１３ヌクレオチド）がDNAであるもの（F）を作製した。これらのポリヌクレオチドは日立計測器サービス株式会社を通じてジェンセット株式会社に合成を委託して、キメラ型ポリヌクレオチドとした後にそれぞれ会合させて作製した。会合方法としてはセンス、アンチセンスDNA-RNAキメラ型１本鎖ポリヌクレオチドを実施例１と同様にして反応させた。２本鎖ポリヌクレオチドの産生はTBE緩衝液中での２％アガロースゲルでの電気泳動で検定した。

（２）標的遺伝子、インディケーター遺伝子、及びDNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドの培養細胞への導入

標的遺伝子を発現するための組換え発現ベクターは、上記（１）に記載のpGL3-Controlを用い、インディケーター遺伝子の発現ベクターは、上記（１）に記載のpRL-TKを用いた。培養細胞としてはヒトCHO-K1細胞（ATCC：CCL-61）を用い、培地はDulbecco's modified Eagle's medium（Gibco BRL社製）に非働化１０％牛胎児血清（Mitsubishi Kasei社製）及び抗生物質としてpenicillin（Meiji社製）１０units／ml、streptomycin（Meiji社製）５０μg／mlを添加したものを用い、３７℃、５％CO_2存在下で培養した。

CHO-K1細胞はそれぞれ０．３×１０^{6}cells／mlの濃度で２４穴プレートにまき、１日後にCa-phosphate沈殿法で１．０μg pRL-TK DNA、１０nMまたは１００nMの各DNA-RNAキメラ型２本鎖ポリヌクレオチドを導入した。

（３）培養細胞内の遺伝子発現の測定

実施例１と同様に、上記実施例４（２）で調製した細胞は２０時間後に回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて、２種類のルシフェラーゼタンパク質の発現量を測定した。蛍光の測定は Lumat LB９５０７ luminometer を用いて行った。

２本鎖ポリヌクレオチドの構造およびコントロール（２本鎖ポリヌクレオチドを導入していない細胞）のルシフェラーゼ活性に対する該ポリヌクレオチドを導入した細胞のルシフェラーゼ活性を図５に示した。図中、白抜きの四角は RNA 鎖を示し、黒い四角は DNA 鎖を示す。図から明らかなように、いずれの塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいても、CHO-K1 細胞に導入した遺伝子の発現は、少なくともポリヌクレオチドの上流約半分を RNA としたそれぞれが２１ヌクレオチドからなる２本鎖ポリヌクレオチドによって阻害された(図５(A)、(C) および (E))。

本実施例で用いたような方法ならびにその他の手法によって、RNAi 効果の発現に必要かつ十分とされる領域を特定あるいは予測し、この領域を含む部分を RNA として保存し、その他の部分を DNA に置換して作製したそれぞれが２１ヌクレオチドからなる２本鎖ポリヌクレオチドは、RNAi 効果によって標的遺伝子の発現を阻害できると推測される。

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

本出願は、2001 年 11 月 21 日出願の日本特許出願（特願 2001－355896）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

産業上の利用可能性

本発明によれば、培養細胞、組織、個体において、ヒトならびにその他の生物種の遺伝子が生体内でどのような機能を有するかを直接的に解析する手段が提供される。また、インディケーターを用いる方法によれば、RNAi 効果の発現が弱い細胞であっても、特に RNAi 効果の高く発現している細胞を一次スクリーニン

グすることができるため、効率のよい解析を行うことができる。

同目的に供される従来の発明技術としては、２本鎖 RNA の導入による RNAi 法が挙げられるが、RNA は特に１本鎖の状態では RNA 分解酵素によって極めて容易に分解され、かつ製造費用が高額であるという問題点がある。本発明では、導入するポリヌクレオチドが完全に RNA であることを限定しない。従って、DNA と RNA からなるポリヌクレオチド、具体的には DNA 鎖と RNA 鎖からなるハイブリッドポリヌクレオチド、又は DNA-RNA キメラポリヌクレオチドを用いることによって導入するポリヌクレオチドの物質としての安定性を高め、製造費用を低減することが可能である。このことから、本発明によれば、導入するポリヌクレオチド自体を疾患治療を目的とした製剤として開発することができる。また、DNA は RNA と比較して蛍光標識、ビオチン標識、アミン化、リン酸化、チオール化等の修飾をより多種にわたり容易に行うことができる。従って、医薬品あるいは試薬として使用する場合に、このような化学的修飾を行うことによって目的に応じた機能を付加することができる。

請求の範囲

１．　標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有するDNAとRNAからなる２本鎖ポリヌクレオチドを、細胞、組織、あるいは個体に導入することを特徴とする標的遺伝子の発現阻害方法。

２．　２本鎖ポリヌクレオチドが、自己相補性を有する１本鎖からなることを特徴とする請求項１に記載の方法。

３．　２本鎖ポリヌクレオチドが、DNA鎖とRNA鎖のハイブリッドであることを特徴とする請求項１または２に記載の方法。

４．　DNA鎖とRNA鎖のハイブリッドが、センス鎖がDNAで、アンチセンス鎖がRNAであることを特徴とする請求項３に記載の方法。

５．　２本鎖ポリヌクレオチドが、DNAとRNAのキメラであることを特徴とする請求項１または２に記載の方法。

６．　２本鎖ポリヌクレオチドが、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流側の一部がRNAであることを特徴とする請求項１～５のいずれかに記載の方法。

７．　上流側の一部が、９～１３ヌクレオチドからなることを特徴とする請求項６に記載の方法。

８．　２本鎖ポリヌクレオチドが、１９～２５ヌクレオチドからなり、該ポリヌクレオチドのうち、少なくとも上流１／２がRNAであることを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の方法。

９．　標的遺伝子が、複数であることを特徴とする請求項１～８のいずれかに記載の方法。

１０．　請求項１～９のいずれかに記載の方法による標的遺伝子の発現阻害の結果、該細胞、組織、あるいは個体に現れる表現型の変化を解析することを特徴とする遺伝子の機能解析方法。

１１．　請求項１～９のいずれかに記載の方法を用いた標的遺伝子の発現の阻害により、細胞、組織、あるいは個体に特定の性質を付与する方法。

１２．　請求項１１に記載の方法により得られる細胞、組織、あるいは個体。

１３．　請求項１２に記載の細胞、組織、あるいは個体に被検物質を添加し、該

細胞、組織、あるいは個体に付与された性質の変化を解析することを特徴とする、標的遺伝子が関与する疾病の予防、及び／または治療剤のスクリーニング方法。

１４．　請求項１３に記載の方法により得られた物質を有効成分とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

１５．　請求項１３に記載の方法により選抜された物質を製剤化することを特徴とする標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤の製造方法。

１６．　請求項１～９のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターを導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が、特定の強さ以上のものを選択して解析することを特徴とする方法。

１７．　請求項１～９のいずれかに記載の方法において、細胞、組織、あるいは個体にさらにインディケータータンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター、及び該DNAの少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列からなり、かつDNAを含む２本鎖RNAを細胞に導入して、該インディケータータンパク質から発せられる信号量が減弱した細胞、組織、あるいは個体を選択して解析することを特徴とする方法。

１８．　インディケータータンパク質が、タンパク質量とそれが発する信号量とが比例して変化していくものである請求項１６または１７に記載の方法。

１９．　インディケータータンパク質が、ルシフェラーゼである請求項１６～１８のいずれかに記載の方法。

２０．　(i) 標的遺伝子の少なくとも一部の塩基配列と実質的に同一の配列を有する２本鎖ポリヌクレオチドであってDNAとRNAのキメラからなるものを作製し、(ii) 該２本鎖ポリヌクレオチドを細胞、組織、あるいは個体に導入し、(iii) 該細胞、組織、あるいは個体中の標的遺伝子の発現阻害度を測定し、(iv) 標的遺伝子の発現阻害にRNAであることが必要とされる配列を特定することを特徴とするRNAi法におけるRNAの機能部位の同定方法。

２１．　２本鎖ポリヌクレオチドが、その２本鎖のどちらか一方がRNA鎖であることを特徴とする請求項２０に記載の方法。

２２．　請求項１～１１、１３、１５～２１のいずれかに記載の方法に用いるた

めの２本鎖ポリヌクレオチド。

２３．　少なくとも請求項２２に記載の２本鎖ポリヌクレオチドを含む標的遺伝子が関与する疾患の予防、及び／または治療剤。

２４．　少なくとも請求項２２に記載の２本鎖ポリヌクレオチドを含む請求項１～１１、１３、１５～２１のいずれかに記載の方法を行うためのキット。

図１

センス鎖：

FLs1: CAUUCUAUCCGCUGGAAGAUG
DFLs1: CATTCTATCCGCTGGAAGATG
FLs1-1:CATTCTATCCGCUGGAAGAUG
FLs1-2:CAUUCUAUCCGCTGGAAGATG

アンチセンス鎖：

FLa2: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC
DFLa2: TCTTCCAGCGGATAGAATGGC
FLa2-1: UCUUCCAGCGGATAGAAUGGC
FLa2-2: TCTTCCAGCGGAUAGAATGGC
FLa2-3: TCTUCCAGCGGAUAGAAUGGC
FLa2-4: UCUTCCAGCGGATAGAATGGC
FLa2-5: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGC
FLa2-6: UCUUCCAGCGGATAGAATGGC
FLa2-7: TCTTCCAGCGGATAGAATGGC
FLa2-8: UCUUCCAGCGGAUAGAAUGGC
FLa2-9: TCTTCCAGCGGAUAGAAUGGC
FLa2-10:UCUUCCAGCGGATAGAATGGC

図２

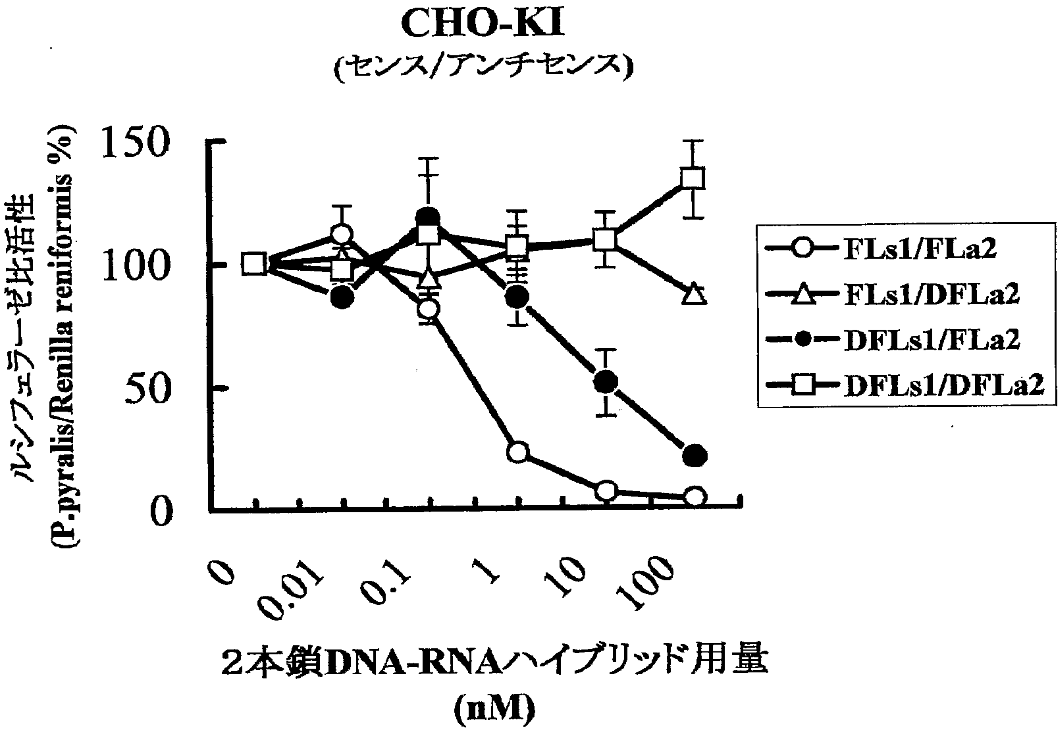

CHO-KI
(センス/アンチセンス)
ルシフェラーゼ比活性
(P.pyralis/Renilla reniformis %)
150
100
50
0
0
0.01
0.1
1
10
100
2本鎖DNA-RNAハイブリッド用量
(nM)
FLs1/FLa2
FLs1/DFLa2
DFLs1/FLa2
DFLs1/DFLa2

図３

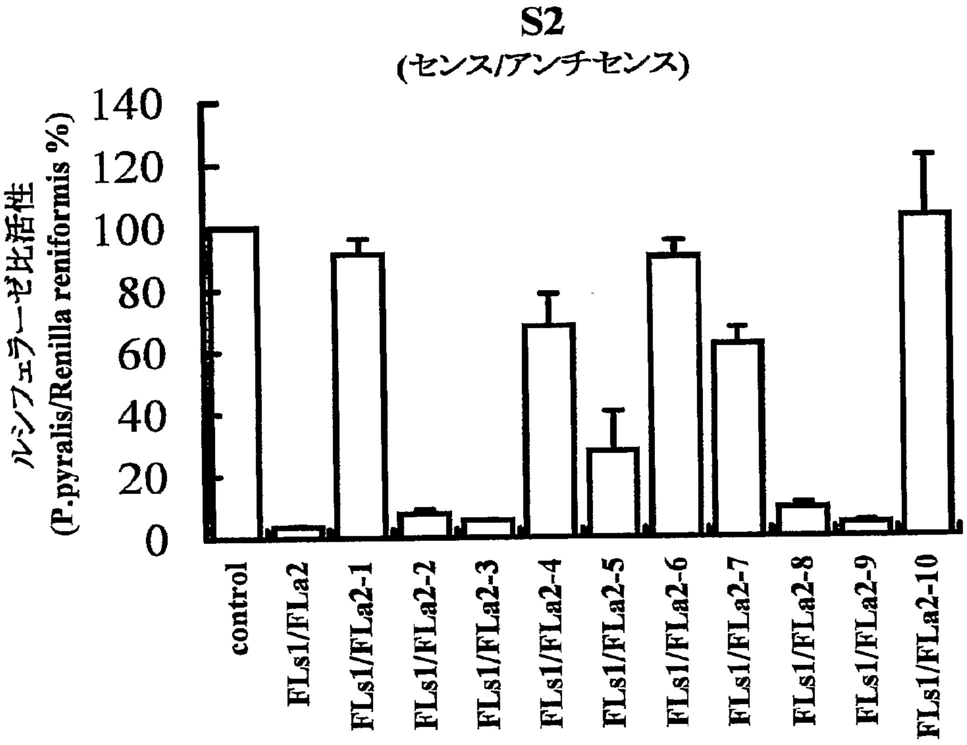

S2
(センス/アンチセンス)
ルシフェラーゼ比活性
(P.pyralis/Renilla reniformis %)
140
120
100
80
60
40
20
0
control
FLs1/FLa2
FLs1/FLa2-1
FLs1/FLa2-2
FLs1/FLa2-3
FLs1/FLa2-4
FLs1/FLa2-5
FLs1/FLa2-6
FLs1/FLa2-7
FLs1/FLa2-8
FLs1/FLa2-9
FLs1/FLa2-10

図４

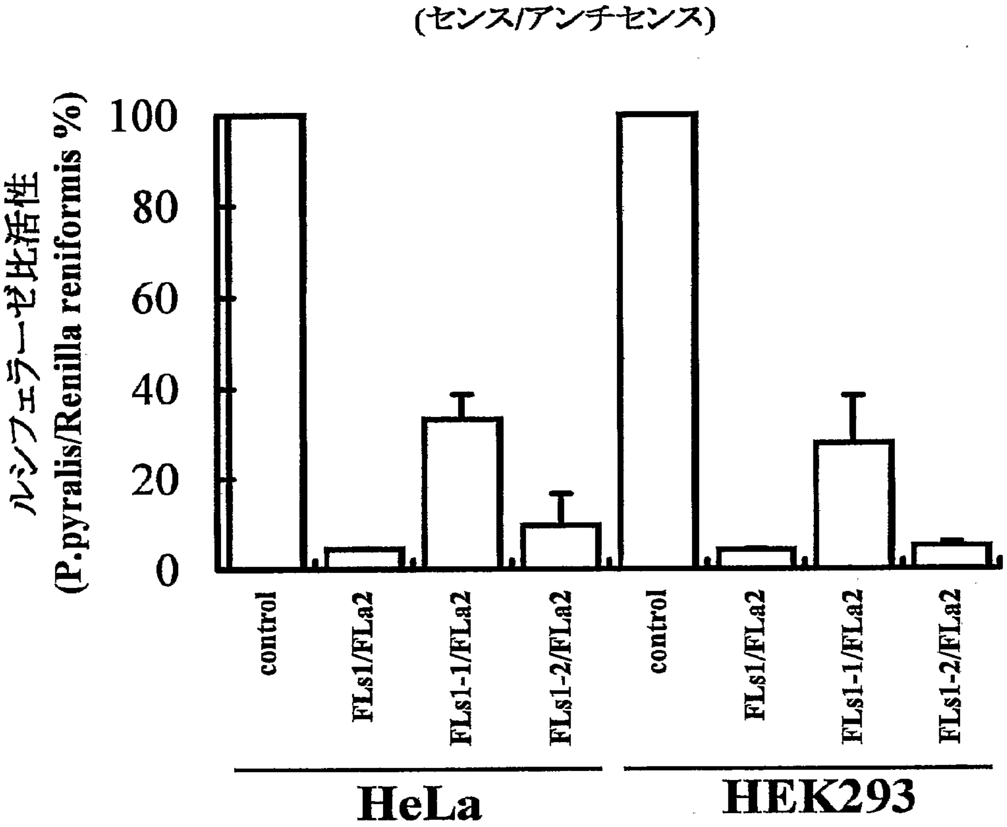
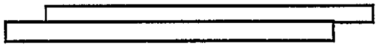
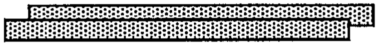
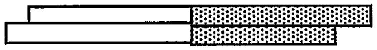
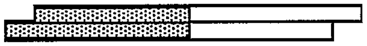
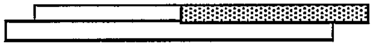
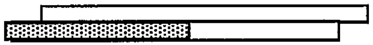

(センス/アンチセンス)
ルシフェラーゼ比活性
(P.pyralis/Renilla reniformis %)
100
80
60
40
20
0
control
FLs1/FLa2
FLs1-1/FLa2
FLs1-2/FLa2
control
FLs1/FLa2
FLs1-1/FLa2
FLs1-2/FLa2
HeLa
HEK293

図5

CHO-K1

	Relative luciferase activity (%)					
	8-28 ▨		38-58 ▨		1087-1107 ▨	
	10nM	100nM	10nM	100nM	10nM	100nM
(A) 	8	4	4	2	8	3
(B) 	98	103	91	98	101	116
(C) 	15	10	15	8	62	31
(D) 	104	99	108	114	94	96
(E) 	12	8	8	5	12	6
(F) 	102	105	95	112	96	93

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION

<120> Genetic Inhibition by doublestranded polynucleotide

<130> P-43361

<140> JP 2001-355896

<141> 2001-11-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 1

cattctatcc gctggaagat g 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 2

cauucuaucc gcuggaagau g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 3

tcttccagcg gatagaatgg c 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 4

ucuuccagcg gauagaaugg c 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 5

acgccaaaaa cataaagaaa g 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 6

acgccaaaaa cauaaagaaa g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 7

ttctttatgt ttttggcgtc t 21

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 8

uucuuuaugu uuuuggcguc u 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 9

ggtaaagttg ttttattttt t 21

<210> 10

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 10

gguaaaguug uuuuauuuuu u 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 11

aaaatggaac aactttaccg a 21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized

<400> 12

aaaauggaac aacuuuaccg a 21